

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA**  
**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD**

**Luis Felipe Moncada**  
**POLISAL-UNAN-Managua**



Monografía para Optar al Título de Licenciatura en Microbiología.

**Diagnóstico Molecular y Convencional de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res comercializada en el Mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua en el periodo Febrero-Marzo del 2016.**

**Autores:**

Bra. Gema de los Ángeles Berrios Obando.

Bra. Sara Gabriela Navarro Suárez.

**Tutor:**

Lic. Isaac Martínez

Bioanalista Clínico

**Asesor:**

Msc.: Francisco Romero Oviedo.

Bioanalista Clínico Msc. En Microbiología Médica.

**Managua, Agosto de 2016.**

## OPINIÓN DEL TUTOR

*Escherichia coli* es parte de la flora anaerobia facultativa del tracto intestinal del hombre y de los animales. Desde hace más de dos décadas, *Escherichia coli* productor de toxina *shiga* (STEC) es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH).

Debido a esto razón en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia Departamento de Aguas y Alimentos se empiezan a desarrollar las técnicas de: Aislamiento de *E. coli* O157 y PCR Convencional para la detección de los genes de virulencia según BAM-FDA: Stx1, Stx2, UidA, eaeA y ehxA.

Este esfuerzo culmina con la realización de esta investigación que lleva por título:

**“Diagnóstico molecular y Convencional de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res comercializa en el Mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua en el periodo de Febrero-Marzo del 2016”**

Teniendo como propósito principal el conocer la circula de esta bacteria en nuestro país.

Como tutor apruebo esta investigación para que sea defendida por sus autoras.

Autoras:

Bra. Sara Gabriela Navarro Suarez

Bra. Gema de los Ángeles Berrios Obando

Tutor:

  
**Lic. Isaac Abraham Martínez Marcia**  
Bioanalista Clínico egresado de la  
Maestría en Microbiología Medica UNAN-LEON

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA**  
**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD**

**Luis Felipe Moncada**  
**POLISAL-UNAN-Managua**



Monografía para Optar al Título de Licenciatura en Microbiología.

**Diagnóstico Molecular y Convencional de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res comercializada en el Mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua en el periodo Febrero-Marzo del 2016.**

**Autores:**

Bra. Gema de los Ángeles Berrios Obando.

Bra. Sara Gabriela Navarro Suárez.

**Tutor:**

Lic. Isaac Martínez

Bioanalista Clínico

**Asesor:**

Msc.: Francisco Romero Oviedo.

Bioanalista Clínico Msc. En Microbiología Médica.

**Managua, Agosto de 2016.**



## **DEDICATORIA**

Dedicamos esta tesis a nuestro Dios padre celestial por habernos dado la sabiduría y la fuerza para la realización de dicha investigación ayudándonos en cada uno de los momentos difíciles a salir siempre adelante.

A nuestros padres quienes con su sacrificio hicieron posible la culminación de esta etapa en nuestra vida, siendo siempre los pilares sobre quienes sostenemos nuestros esfuerzos y a quienes confiamos nuestros sueños y futuros éxitos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios todo poderoso** por permitirnos concluir nuestra carrera exitosamente y habernos guiado e iluminado en cada momento.

A **nuestros padres** por brindarnos su apoyo incondicional durante el transcurso de nuestra carrera y al **resto de nuestra familia** por acompañarnos con sus oraciones y bendiciones.

Al **nuestros docentes** por compartir con nosotros sus conocimientos, habilidades y ayudarnos en nuestra formación profesional.

A **nuestro Tutor** Lic. Isaac Abraham Martínez Marcia y Asesor Msc. Francisco Romero Oviedo por apoyarnos a realizar la investigación y por compartir sus conocimientos.

Al **CNDR-MINSA** por apoyarnos en los materiales necesarios para elaborar la tesis.

*¡A todos muchas gracias!*

## RESUMEN

El presente estudio es de tipo descriptivo de corte transversal, cuyo principal objetivo fue determinar la presencia de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res que se expende en el mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua en el periodo Febrero-Marzo de 2016.

El universo estuvo conformado por 12 expendios que comercializan carne molida de res, la muestra está constituida por 2 lotes de 5 sub-muestras cada uno de ellos dando un total de 10 muestras de carne molida analizada. Para la selección de la muestra se utilizó el muestreo no probabilístico por conveniencia, se utilizó base estadística descriptiva y tablas de contingencia. Para la elaboración del documento y realización de la tablas se utilizaron los programas de Microsoft office Word, Microsoft office Excel.

Los resultados encontrados fueron 50% (5) positivo en el aislamiento a través de medios selectivos esto puede deberse a la influencia de varios factores entre los cuales podemos mencionar: falta de higiene en la manipulación de la carne, el lugar de procesamiento y sacrificio de las reses, lo que crea un medio favorable para el desarrollo de *Escherichia coli* O157 y el diagnóstico molecular de sus genes de virulencia que es de vital importancia para producir la enfermedad lo que cabe mencionar que con la realización del presente estudio se comprobó que la prevalencia de este microorganismo en este tipo de alimento es muy significativa para el mercado en estudio.

Recomendamos al CNDR-MINSA a realizar nuevos estudios de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res comercializados en los diferentes Mercados del País para determinar la frecuencia de esta bacteria y sus genes de virulencia lo que va permitir detectar oportunamente *E.coli* enterohemorrágica.

## INDICE

	Pág.
<b>OPINIÓN DEL TUTOR</b>	
<b>DEDICATORIA</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	
<b>RESUMEN</b>	
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
III. Justificación	4
IV. Planteamiento del Problema	5
V. Objetivos	6
VI. Marco Teórico	7
1. Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	7
2. Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	8
2.1. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ECET)	8
2.2. <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (ECEH9)	9
2.3. <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (ECEI)	9
2.4. <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (ECEP)	10
3. <i>Escherichia coli</i> O157	11
3.1. Características Bioquímicas	12
3.2. Factor de Virulencia	12
3.3. Patogénesis e Inmunidad	14
3.4. Transmisión de <i>Escherichia coli</i> O157	16
3.5. Alimentos Asociados a la Infección	16
3.6. Periodo de Incubación	17
3.7. Manifestaciones Clínicas	17
3.8. Tratamiento	18
3.9. Prevención	18
3.10. Métodos Diagnósticos	19
<b>VII. DISEÑO METODOLOGICO</b>	<b>30</b>
<b>VIII. OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES</b>	<b>37</b>
<b>IX. ANALISIS DE LOS RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	<b>44</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS</b>	

## I. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las Enfermedades de Transmisión por Alimentos (ETA) constituye uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. En los últimos años se presentaron brotes ocasionados por patógenos emergentes. Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Escherichia coli* O157 en carnes (FAO/OMS, 2005).

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales desafíos para la Salud. Este microorganismo está asociado a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), desarrollando enfermedad diarreica aguda (EDA), Colitis Hemorrágica (CH), Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) o Púrpura Trombocitopénica (PTT), en seres humanos. La enfermedad es causada por la producción de grandes cantidades de una o dos toxinas producidas en vivo, causando severos daños intestinales y renales. La mayoría de los brotes provocados por *Escherichia coli* O157 han sido atribuidos al consumo de productos de carne bovina mal cocida, por lo que la carne molida es uno de los principales reservorios (Rivas, Leotta, & Chinen., 2008).

Para la determinación de este agente existen diversas metodologías internacionales, entre ellas la técnica de aislamiento de *Escherichia coli* O157 norma según FDA-BAM que consta de 3 etapas: enriquecimiento, aislamiento e identificación se utiliza para recuperar microorganismos patógenos, que se encuentran en bajo número, a partir de muestras de alimentos donde hay una elevada concentración de microorganismos comensales. Otro método de detección son la separación inmunomagnética (Dynabeads) y las técnicas moleculares entre estas la Reacción en Cadena de la Polimerasa Convencional (PCR convencional). Técnica muy sensible que permite la amplificación de fragmentos pequeños de ADN específicos. (Rivas, Leotta, & Chinen., 2008)

## II. ANTECEDENTES

El primer aislamiento descrito de *Escherichia coli* O157 en el ganado bovino fue en Argentina en 1977, en un ternero de menos de tres semanas de edad con colibacilosis. Desde su aislamiento y reconocimiento como patógeno en el ser humano por primera vez en el año 1982 en los EE.UU. a partir de un brote de colitis hemorrágica, debido al consumo de hamburguesas elaboradas con carne bovina, se ha incrementado el número de notificaciones de brotes y casos en el mundo

En Colombia un estudio reveló una incidencia de *Escherichia Coli* O157 en bovinos sanos de 6.5% la alta incidencia encontrada en bovinos indica que el ganado sano es un reservorio importante, este hecho indica la necesidad de potenciar medidas higiénicas en los sitios de sacrificio de los animales y así mismo la implementación de programas educacionales respecto al proceso de cocción de las carnes; esencialmente en el área de mayor prevalencia del patógeno. (Martinez & Platero, 2007)

En 2001 en la universidad de Córdoba se realizó un estudio de "*Escherichia coli* O157 enterohemorrágica: un agente etiológico de diarrea y zoonosis" en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos. Se procesaron 325 muestras fecales de porcinos, 100 muestras de canal bovina y 20 muestras de carne molida. Los resultados mostraron una frecuencia de aparición de *Escherichia coli* O157 de 4.6% en muestras fecales porcinas en el departamento de Córdoba, 2% en canales bovinas y 10% en carne molida (Salim, I, & Arrieta, 2001).

En 2003 se realizó un estudio en Lima, Perú de "Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 a partir de carne molida de bovino obtenida en diferentes mercados de abastos". Se analizaron 195 muestras; Para determinar la presencia de shigatoxina (*stx1*, *stx2*) e intimina (*eae A*) se empleó la técnica de PCR multiplex en tiempo real y para enterohemolisina la prueba de hemólisis. El 87.18% de la muestras fue positivo para *E. coli*. Se obtuvieron 3 (1.54%) cepas de *E. coli* O157:H7, una *stx1* +/*stx2* +/*eaeA* - y enterohemolisina -, una *stx1* +/*stx2* -/*eaeA* + y enterohemolisina - y la otra *stx1* -/*stx2* -/*eaeA* - y enterohemolisina +. También se obtuvieron 4 cepas (2.05%) de *E. coli* O157 no H7, ninguna presentó factores de virulencia. El estudio reveló el riesgo potencial de que *E. coli* O157 afecte a la población de Lima. (Méndez, Vergaray, Morante, & Flores, 2013)

En 2010 en provincia de Tucumán en Argentina se realizó un estudio "Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca" se diagnosticaron dos casos de síndrome urémico hemolítico (SUH). Se recolectaron 53 muestras de carne molida fresca en carnicerías de la ciudad de Concepción. Para la detección, el aislamiento y la caracterización de STEC O157 se utilizaron dos técnicas de PCR; Siete muestras fueron positivas para el gen *stx2*, de las cuales 4 también fueron positivas para el gen *rfb*O157. Sin embargo, solo se aisló una cepa de *E. coli* O157 biotipo C, portadora de los genes *eae*, *stx2* y *ehxA*. (Jure, y otros, 2010)

### III. JUSTIFICACIÓN

Las ETA constituyen un problema mundial ya que son una importante causa de morbilidad y mortalidad y producen un gran impacto económico tanto por los gastos en salud, como en las actividades económicas relacionadas con la producción de alimentos. Las acciones de prevención y control se han complicado debido a factores asociados con cambios globales, tales como el crecimiento de la población, la pobreza y la urbanización (FAO/OMS, 2012).

Los productos cárnicos son el segundo alimento de mayor demanda en los mercados capitalinos dado a su elevado contenido nutricional. Según los informes y registros del MINSA estos forman parte de los productos más vinculados a Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Nicaragua, además afirman que los sitios que originan las mismas son: Los hogares, los comedores populares (fritangas) y las escuelas. (Gutiérrez, 2009)

La preocupación de este producto se basa en la frescura que presta a los aspectos sanitarios; por su propia naturaleza y origen, no sólo es muy sensible a la alteración, sino que frecuentemente está también implicada en la difusión de enfermedades transmitidas con los alimentos; a pesar de los muchos avances que han tenido lugar en los últimos 100 años en la higiene del procesado de este alimento, la preocupación por el papel de los productos cárnicos como causa de toxiinfecciones está aumentando en lugar de disminuir y su importancia como problema de salud pública es por su producción de toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*

Debido a la importancia clínica de este microorganismo y a las pocas investigaciones publicadas en Nicaragua, decidimos realizar un estudio de diagnóstico Molecular y convencional de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res expendidos en el Mercado Iván Montenegro uno de los mercados más visitados del país.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

##### **Planteamiento del problema para el objetivo general:**

¿Estarán las carnes molidas comercializadas en el Mercado Iván Montenegro de Managua contaminadas con *Escherichia coli* O157?

##### **Planteamiento del problema para los objetivos específicos:**

¿Se podrá analizar la presencia de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res por el método de la FDA según Manual Analítico Bacteriológico?

¿Se detectaran los genes de virulencia: *Stx<sub>1</sub>*, *Stx<sub>2</sub>*, *eaeA*, *uidA* y *ehxA* de *Escherichia coli* O157 mediante la técnica de PCR convencional?

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la presencia de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res que se expende en el mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua en el periodo Febrero-Marzo de 2016

### Objetivos específicos

1. Analizar la presencia de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res por el método de la FDA según Manual Analítico Bacteriológico.
2. Determinar genes de virulencia: *Stx<sub>1</sub>*, *Stx<sub>2</sub>*, *eaeA*, *uidA* y *ehxA* de *Escherichia coli* O157 mediante la técnica de PCR convencional.

## VI. MARCO TEORICO

### 1. Generalidades de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteraceae*, es un microorganismo gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, sus cepas forman la mayor parte de la flora comensal del tubo digestivo de animales y humanos, eliminándose por las heces al exterior. Por esto, es frecuente que se encuentren en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento constituye un indicador de contaminación fecal (Bonivento, Molina, & Maestre, 2011).

#### 1.1. Estructura antigénica

Las *Enterobacteriáceas* poseen una compleja estructura antigénica. Se han clasificado más de 150 diferentes antígenos somáticos O (lipopolisacáridos) termoestables, más de 100 antígenos K (capsulares) termolábiles y más de 50 antígenos H (flagelares).

Los antígenos O son la parte más externa de la pared de la célula bacteriana y constan de unidades repetidas de polisacáridos. Algunos polisacáridos O contienen azúcares únicos. Los antígenos O son resistentes al calor y al alcohol, generalmente se detectan mediante aglutinación bacteriana. Los antígenos K son antígenos O externos sobre algunas, pero no todas, las *Enterobacteriáceas*. Algunos son polisacáridos, incluso los antígenos K de la *Escherichia coli* otros son proteínas. Los antígenos K pueden interferir con la aglutinación por antisuero O y a veces se asocian con virulencia.

Los antígenos H se localizan sobre los flagelos y se desnaturalizan o retiran mediante calor o alcohol. En las variedades de bacterias dotadas de motilidad se les puede conservar mediante tratamiento con formalina. Estos antígenos H se aglutinan con anticuerpos H. Los determinantes de los antígenos H son una función de la secuencia de aminoácidos en la proteína flagelar. Los microorganismos tienden a cambiar de una fase a la otra; esto se denomina variación de fase. Los antígenos H sobre la superficie de la bacteria a veces interfieren con la aglutinación por anticuerpos anti-O. (Martinez & Platero, 2007)

## **2. Clasificación de *Escherichia coli***

### **2.1. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)**

Colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones. Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua e iones.

Las ECET son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%.

## **2.2. *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)**

Es caracterizada por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida.<sup>11</sup> La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. Karmali en 1983, la asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *Escherichia coli* verotoxigénicas (VTEC).

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. Además de la toxina, tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gene cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gene *eae* también se encuentra en las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina.

## **2.3. *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)**

Este grupo y *Shigella* spp están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) es la invasión del epitelio del colon; para ello el

primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes.

Los síntomas característicos en personas infectadas son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce *Escherichia coli* enterotoxigénica. La cepa se asocia más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.

#### **2.4. *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP)**

Fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E).

Las cepas ECEP se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para el Bfp; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes *eae* pero no el plásmido EAF. Puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años.

## **2.5. *Escherichia coli* enteroagregativa**

En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2.

La adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gene *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa.

## **2.6. *Escherichia coli* de adherencia difusa**

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. (Rodriguez g. , 2002)

## **3. *Escherichia coli* O157**

*Escherichia coli* O157 pertenece al grupo de *Escherichia coli* enterohemorrágica, es un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos. En 1982 fue reconocido por primera vez como patógeno humano responsable de dos brotes de diarrea sanguinolenta severa que afectaron a 47 personas en EE.UU. Los brotes fueron asociados epidemiológicamente con hamburguesas contaminadas, consumidas en restaurantes

pertenecientes a una cadena de comidas rápidas. A partir de entonces numerosos brotes han sido notificados en distintas partes del mundo. (Martinez & Platero, 2007)

### **3.1. Características Bioquímicas**

Dentro de las características bioquímicas diferenciales de *Escherichia coli* O157 se encuentran las siguientes: no fermenta el sorbitol en 24 horas, no posee capacidad glucuronidasa, y no crece a temperaturas de 44-45,5°C. Es capaz de crecer en ambientes muy ácidos (pH 2,5 a 3,0), multiplicarse a temperaturas tan bajas como 7°C y mantenerse viable durante meses en carne congelada a -20°C (Blanco y col., 1996a).

### **3.2. Factores de Virulencia**

3.2.1. **Citotoxinas.** Las toxinas Shiga (Stx) son el principal factor de virulencia de EHEC poseen estructura de subunidades A-B y están codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa y la B (7,5 KDa), presente en cinco copias, es la que se une al receptor celular específico globotriaosilceramida (Gb3). Las Stxs se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2, según la neutralización del efecto citotóxico en células Vero o HeLa con anticuerpos específicos, o por la detección de los genes *Stx* mediante técnicas de biología molecular. El grupo de Stx1 es bastante homogéneo.

Las cepas ECEH de origen humano, animal o de alimentos pueden producir Stx1, Stx2 o variantes de Stx1 o Stx2, solas o en combinación de dos o más toxinas (Stx1/Stx2, Stx1/Stx2v, Stx1c/Stx2, Stx1c/Stx2d, Stx2/Stx2v).

Si bien los miembros de la familia de Stx muestran similitud en su estructura y función, cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1. Asimismo, se ha determinado que Stx1 y Stx2 son más citotóxicas en células Vero que las variantes Stx2c y Stx2d, esto se debe principalmente a la existencia de diferencias en la secuencia nucleotídica de la subunidad B responsable de la unión de la toxina al receptor Gb3.

3.2.2. **Plásmido pO157.** Este plásmido de 90 Kb, se encuentra en la mayoría las cepas de EHEC O157 y contiene diversos genes que codifican para los siguientes factores de virulencia: *espP* (serina proteasa extracelular), *katP* (catalasa-peroxidasa), *hlyA* (enterohemolisina), *etp* (sistema de secreción tipo II) y para una fimbria que podría estar involucrada en la colonización inicial de los enterocitos. En algunos serotipos de STEC no-O157 se identificaron plásmidos con una secuencia similar al pO157. Sin embargo, el rol preciso de los genes codificados en estos aún no fue dilucidado.

### 3.2.3. Factores de adherencia intestinal

✓ **Codificados en la región LEE** (del inglés, locus of enterocyte effacement) del cromosoma. En la misma se encuentra el gen *eae*, el cual codifica una proteína denominada intimina responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocitos y de la desorganización de las microvellocidades con producción de la lesión AE (del inglés, attaching and effacing). La formación de lesión A/E está asociada con un drástico reordenamiento del citoesqueleto de la célula huésped, dando como resultado la producción de una estructura con forma de pedestal rica en actina polimerizada. La región LEE codifica además reguladores transcripcionales,

chaperonas, el sistema de secreción de tipo III (TTSS) empleado en el transporte de las proteínas efectoras hacia la célula huésped, translocadores, y proteínas efectoras incluyendo al receptor translocado de la intimina denominado Tir (del inglés, **translocated intimin receptor**). Se considera que ciertos serotipos de ECEH -LEE positivos (O157, O26:H11, O111: NM y O145: NM) son altamente virulentos y están asociados a brotes y casos esporádicos de enfermedad severa en humanos.

- ✓ **Codificados fuera de la región LEE.** Se ha descrito un grupo adhesinas relacionadas con la adherencia de las cepas ECEH

Al enterocito, las adhesinas Iha (del inglés, **iron regulated gene A homologue adhesin**); Efa1

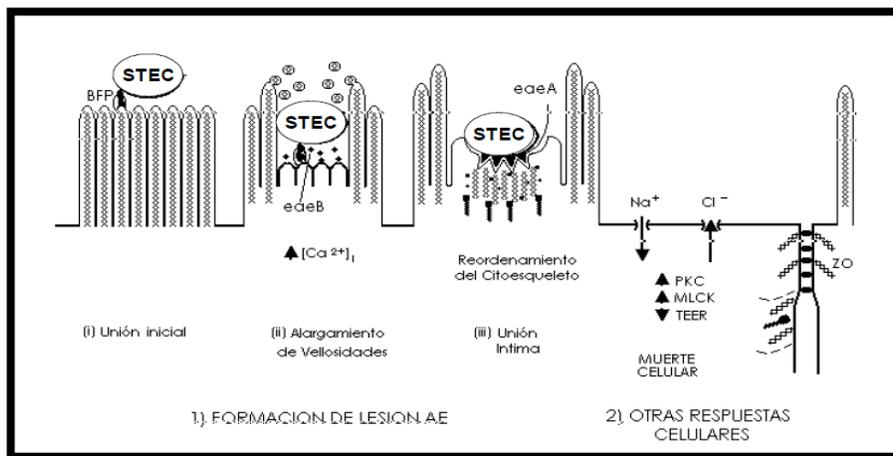
(Del inglés, **EHEC factor for adherence**); LPFO157/OI- 141; LPFO157/OI-154 y LPFO113/OI-154 (del inglés, **long polar fimbria**). Estas adhesinas están codificadas en islas genómicas únicas de *E. coli* EDL933. Otras tres adhesinas, ToxB (proteína identificada en pO157, Saa (del inglés, **STEC autoagglutinating adhesin** identificada en cepas LEE negativas) Sfp (del inglés, **sorbitol fermenting plasmid**) están codificadas en el megaplásmido de cepas STEC Si bien los serotipos difieren en su virulencia, la incidencia y la severidad de las infecciones no pueden atribuirse únicamente a los factores de virulencia de STEC, sino que son el resultado de la interacción del patógeno con factores del huésped y el ambiente. (Rivas, Leotta, & Chinen., 2008)

### **3.3. Patogénesis e Inmunidad**

Los genes responsables de los factores de virulencia suelen estar asociados en grupos denominados Islas de patogenicidad estas agrupaciones se van confirmado evolutivamente y confieren ventajas a los patógenos emergentes *Escherichia coli* O157 coloniza sobre las células epiteliales intestinales con formación de una lesión histopatológica característica donde se destruyen las microvelocidades. A la vez que produce una o más Citotoxinas que

son transportadas a través de la barrera epitelial. La diarrea es generalmente auto limitada y un promedio de 8 días se caracteriza por el dolor abdominal y comienza siendo acuosa pero se vuelve pronto sanguinolenta.

La lesión causada a los enterocitos, induce a estos a liberar citoquinas proinflamatorias, como la interleucina 8 (IL-8), simultáneamente intervienen células del sistema inmune las células M del epitelio intestinal toman muestra de los antígenos bacterianos e inducen a los macrófagos a liberar interleucina 1 (IL-1) por el factor de necrosis tumoral (TFN) una serie de eventos del sistema inmune resultan en un incremento de la citotoxicidad y el daño ocasionado a las células endoteliales de los pequeños vasos sanguíneos lo que puede causar Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que se caracteriza por anemia, trombocitopenia y fallo renal



**Adaptado de Rivas, et al., 2008.**

Se conocen otras adhesinas que permiten colonizar el intestino, la mayoría de la STEC que producen una diarrea sanguinolenta tienen en común el mecanismo de adhesión con las que actualmente se denominan enteropatógena, el cual está codificado en una zona del cromosoma denominada isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Allí están los genes que codifican para producir una lesión histopatológica típica denominada

A/E, consiste en la atrofia de las microvelocidades de la mucosa del intestino delgado y la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial. Dentro de la isla LEE se encuentran los genes *eae*, *esp*, *tir* y *esc*. Los genes *eae* han sido asociados a la secreción de una proteína de 94 a 97 kd llamada intimina y que es responsable de la adherencia íntima de la bacteria al epitelio intestinal. Los genes *esp* son los responsables de la secreción de proteínas necesarias para activar señales de transducción a través del epitelio que conducen a la destrucción del citoesqueleto. Los genes *tir* codifican una proteína *Tir* (Translocated intimin receptor), que luego de producida es exportada y después de ser fosforilada se inserta en la membrana del epitelio intestinal del humano sirviendo de receptor de la intimina. El grupo de genes *esc* pertenece a un sistema de secreción de tipo III que codifica para las proteínas responsables de la exportación de factores de virulencia *Escherichia coli* O157:H7 tiene además un plásmido de 60 MDa (pO157) que codifica para una serina proteasa extracelular (*espP*), Catalasa-peroxidasa (*KatP*), enterohemolisina (*hlyA*), sistema de secreción tipo II (*etp*) y fibrinas involucradas en la colonización (Lound & Tanaro, 2013).

### **3.4. Transmisión de la *Escherichia coli* O157**

El organismo puede vivir en los intestinos de ganado saludable. La carne puede contaminarse durante el proceso de sacrificio por contacto fecal. Las bacterias presentes en las ubres de las vacas o en los equipos de ordeño pueden también contaminar la leche cruda.

La infección en los seres humanos generalmente ocurre por la ingestión de alimentos contaminados. No se transmite por el aire ni a través del contacto normal interpersonal, aunque la transmisión de persona a persona en hogares, centros de atención de niños y ancianos, por la vía fecal-oral, sí puede ocurrir. Los niños pequeños usualmente expulsan

los organismos en sus heces durante una semana o dos después de haber rebasado la enfermedad. Los niños mayores raramente son portadores asintomáticos.

### **3.5. Alimentos asociados a la infección**

Hamburguesas de carne crudas o poco cocinadas han estado implicadas en casi todos los brotes documentados y en los casos esporádicos. La leche cruda también ha estado involucrada en casos de la enfermedad. Otros alimentos, sin embargo, pudieran ser fuente de infección. (Rodríguez, Batista, & Feal, 1997)

### **3.6. Período de incubación**

El periodo de incubación de la enfermedad causada por la ECEH O157 varía de 1 a 16 días. La mayoría de las infecciones se manifiestan después de 3 a 4 días; sin embargo, el periodo medio de incubación es de 8 días.

### **3.7. Manifestaciones Clínicas**

Los humanos pueden infectarse de forma asintomática o pueden desarrollar diarrea acuosa, colitis hemorrágica y/o síndrome urémico hemolítico. La mayoría de los casos sintomáticos comienzan con diarrea. Algunos casos se resuelven sin tratamiento en aproximadamente una semana, otros evolucionan a colitis hemorrágica en unos días, que se caracteriza por diarrea con sangre profusa y visible, acompañada de distensión abdominal y en muchos casos, espasmos abdominales.

Algunos pacientes presentan fiebre baja, en otros, la fiebre está ausente. Se pueden observar náuseas y vómitos, y es posible la deshidratación. Muchos casos de colitis hemorrágica son

auto limitantes y se resuelven en aproximadamente una semana. La colitis grave puede provocar necrosis intestinal, perforación o el desarrollo de estenosis en el colon.

El síndrome urémico hemolítico se produce en 16% de los pacientes con colitis hemorrágica. Este síndrome es más frecuente en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Generalmente, se desarrolla una semana después del comienzo de la diarrea, cuando el paciente se está mejorando.

En ocasiones, los niños desarrollan SUH sin diarrea prodrómica. Este síndrome se caracteriza por insuficiencia renal, anemia hemolítica y trombocitopenia. La importancia relativa de estos signos varía. Algunos pacientes con SUH presentan anemia hemolítica y/o trombocitopenia con poca o ninguna enfermedad renal, mientras que otros presentan enfermedad renal significativa pero sin trombocitopenia y/o hemólisis mínima. Son habituales los signos extrarenales, incluso los relacionados al SNC con letargo, irritabilidad y convulsiones. La forma del SUH que generalmente se observa en adultos, especialmente ancianos, en ocasiones se denomina púrpura trombocitopénica trombótica (PTT. (*Escherichia coli* enterohemorrágica, 2010)

### **3.8. Tratamiento**

No existe una terapia específica para las infecciones causada por *Escherichia coli* O157. Si bien, esta bacteria es susceptible a la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados comúnmente, aún no se confirma que el antibiótico aporte algún beneficio para el paciente ya que puede barrer la flora normal y causar una reinfección por *Shigella*.

No deben usar agentes antidiarreicos, que disminuyen la motilidad intestinal, pues estudios retrospectivos señalan un riesgo aumentado de evolución a SUH. En el período agudo del SUH, el tratamiento está basado en el control de las alteraciones fisiopatológicas como ser

la restricción de agua y sal, las transfusiones de sedimento globular, la diálisis peritoneal y el adecuado aporte calórico-proteico. (Rivas, Leotta, & Chinen., 2008)

### **3.9. Prevención**

Al igual que para otros agentes patógenos, tener animales y productos crudos libres de STEC es prácticamente imposible. A pesar de ello, los riesgos pueden ser disminuidos aplicando buenas prácticas de manufactura y de higiene estableciendo puntos críticos de control durante toda la cadena de producción del alimento. Las principales medidas para controlar la transmisión de STEC y prevenir la infección son:

Aplicar controles en los puntos críticos de la elaboración de alimentos.

- a) Asegurar una correcta y homogénea cocción de la carne
- b) Tener especial cuidado con la cocción de la carne picada, ya que generalmente se cocina bien la parte superficial, pero no en el interior, permaneciendo la bacteria viable.
- c) Utilizar distintos utensilios de cocina para trozar la carne cruda y para cortarla antes de ser ingerida.
- d) Evitar el contacto de las carnes crudas con otros alimentos (contaminación cruzada).
- e) Asegurar la correcta higiene de las manos y utensilios de cocina. Deben lavarse siempre con agua y jabón antes y durante la preparación de los alimentos y después de manipular carne cruda.
- f) Lavar las manos con agua y jabón luego de ir al baño.
- g) Evitar el consumo de alimentos en lugares con animales que puedan ser portadores (Rivas, Leotta, & Chinen., 2008).

### **3.10. Métodos de Diagnóstico**

#### **3.10.1. Cultivo**

Muchas especies bacterianas son tan parecidas morfológicamente que es imposible diferenciarlas sólo con el uso del microscopio. En este caso, para identificar cada tipo de bacteria, se estudian sus características bioquímicas sembrándolas en medios de cultivo especiales.

#### **3.10.2. Preenriquecimiento**

La etapa de enriquecimiento se utiliza para recuperar microorganismos patógenos, que se encuentran en bajo número, a partir de muestras de alimentos donde hay una elevada concentración de microorganismos comensales. Por ejemplo las bacterias gram positivas son mantenidas en una prolongada fase de letargo o directamente son inhibidas en el caldo de enriquecimiento selectivo, permitiendo que las pocas células bacterianas de STEC O157 entren en fase logarítmica de crecimiento no inhibida, pudiendo competir mejor por su supervivencia.

Normalmente los medios enriquecidos usados son agua tamponada con peptona suplementada con 8 mg/litro de vancomicina, 10mg/litro de cefsulodina, suplementado con 20 mg/litro de novobiocina o 10 mg/litro de acriflavina para suprimir el crecimiento de organismos Gram positivos, *Aeromonas* spp. Y *Proteus* spp.

### 3.10.3. Medios Selectivos

#### ✓ Agua Peptonada Bufferada Modificada con Piruvato

Digerido enzimático de caseína y ácido Recopilación de caseína son las principales fuentes de nitrógeno, mientras que el extracto de levadura proporciona las vitaminas y minerales esenciales en Modificado agua de peptona tamponada con piruvato. La lactosa es la fuente de energía de carbono. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico; Fosfato de Sodio y Potasio Fosfato son los agentes tampón. Piruvato de sodio se utiliza para estimular el crecimiento, mientras que los antimicrobianos agentes inhiben organismos distintos a *E.coli* O157

#### ✓ Agar MacConkey con Sorbitol

El agar MacConkey que contiene 1% de D-sorbitol en lugar de lactosa (SMAC) es un medio útil y barato sobre el que crece el *E. coli* que no fermenta el sorbitol en pequeñas colonias redondas blanco-grisáceas. La selectividad se mejora mediante la adición de 2,5 mg/litro de Telurito potásico además de la Cefixime (CT-SMAC), que tiene un mayor efecto inhibitor frente a *E. coli* no-0157 y otros no fermentadores de sorbitol, como *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Morganella* y *Providencia*, que frente a *E. coli* O157. Este es el medio más usado para aislar *E. coli* O157. (OIE, 2004).

#### • Fundamento

Es un medio de diferenciación parcialmente selectivo para el aislamiento de *E. coli* O157 a partir de muestras clínicas, veterinarias, alimentarias y medioambientales. Las peptonas son fuentes de nitrógeno. D-Sorbitol es un carbohidrato fermentable. La mayoría de las cepas hemorrágicas de *E. coli* no fermentan el sorbitol y producen colonias incoloras en agar

MacConkey Sorbitol. Las sales biliares y el cristal violeta son agentes selectivos que inhiben el crecimiento de organismos gram positivos. El rojo neutro es un indicador del pH. (Becton Dickinson and Company, 2003)

### ✓ **CHROMagar O157**

Está destinado para el aislamiento, la diferenciación y la identificación presuntiva de *E. coli* O157. Debido a los sustratos cromogénicos en el medio, las colonias de *E. coli* O157 producir un color malva, permitiendo así la identificación presuntiva de la placa de aislamiento primario y la diferenciación de otros organismos.

- **Fundamento**

La característica diferencial de los medios cromogénicos se basa en la detección de la actividad de dos enzimas:

1)  $\beta$ -D -galactosidasa presente en todas las cepas de *E. coli* independientemente del serotipo.

2)  $\beta$ -D-glucuronidasa presente en la mayoría de las cepas de *E. coli* no-O157.

Cada medio comercial contiene diferentes cromógenos para evidenciar la actividad enzimática específica.

Las colonias presentarán colores específicos (según el cromógeno utilizado por el fabricante) que van a orientar la obtención de *E. coli* O157/NM. (Rivas, Leotta, & Chinen., 2008)

### **3.10.4. Pruebas Bioquímicas**

Se debe confirmar bioquímicamente que las colonias que crecen sobre medios sólidos, sospechosas de VTEC, son de E.coli. Las VTEC son bioquímicamente similares a otras E.coli. Las cepas de VTEC 0157 difieren en que no fermentan el sorbitol y no producen beta-glucuronidasa.

#### **✓ CALDO EC (*Escherichia coli*)**

La lactosa es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa presente en las bacterias coliformes, generándose como subproductos glucosa y galactosa que, secuencialmente, son metabolizados hasta ácidos y CO<sub>2</sub>; este último se detecta en las campanas de Durham. Cuando la fermentación de lactosa se lleva a cabo a 44.5 °C la prueba positiva indica presencia de *Escherichia coli*. Las sales biliares inhiben el crecimiento de Gram positivos. La peptona de caseína proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de las bacterias y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. (DIBICO S.A. , 2010)

#### **✓ EC-MUG (*Escherichia coli*, Caldo con metilumbeliferil glucurónido).**

La peptona biotriptasa proporciona al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de las bacterias. Las sales biliares inhiben el crecimiento de Gram positivos. La lactosa es la fuente de energía para los coliformes especialmente *Escherichia coli* que la fermentan con producción de gas. *Escherichia coli* produce la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa, que actúa sobre el sustrato 4-metilumbeliferil-  $\beta$ -glucurónido (MUG), transformándolo en 4-metilumbeliferona. Este compuesto se caracteriza por ser fluorescente al iluminarse con una lámpara de luz UV de 366 nm, lo que permite su detección fácilmente y por lo tanto, es un indicador de la presencia de *Escherichia coli*. (DIBICO S.A. , 2010)

### ✓ **Agar Citrato Simmons.**

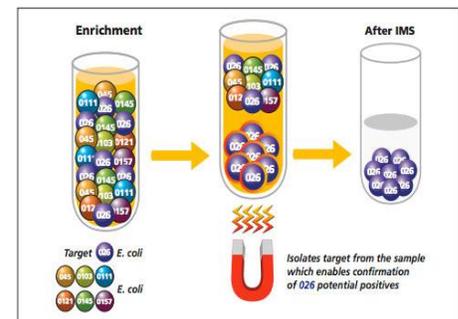
El agar Citrato de Simmons se recomienda para la diferenciación de la familia *Enterobacteriaceae* basada en la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono. Un microorganismo que puede utilizar el citrato como fuente de carbono también utiliza las sales de amonio como única fuente de nitrógeno, éstas son degradadas a amoníaco alcalinizando el medio con lo cual se genera el viraje del indicador azul de bromotimol de verde a pH neutro a un color azul a pH alcalino, considerándose de esta forma la reacción como positiva.

### ✓ **(MIO) Movilidad, Indol y Ornitina**

Es un medio que se utiliza para determinar la presencia de flagelos, así como las enzimas descarboxilasa de Ornitina y triptofanasa. Por lo tanto, sirve para determinar la movilidad ya que, descarboxilación de la Ornitina y producción de Indol. (CNDR, MINSA, 2004).

### **3.10.5. Separación Inmunomagnética**

Se ha utilizado la separación inmunomagnética (MS) como técnica de concentración selectiva para mejorar el aislamiento de *E. coli* 0157:H7 donde la cantidad de organismos es baja. Partículas paramagnéticas disponibles comercialmente o bolas recubiertas con anticuerpo anti-lipopolisacáridos (LPS) se mezclan con la muestra de prueba. Las bolas con bacteria ligada se separan del sobrenadante por un campo magnético y después del lavado se ponen sobre agar selectivo y se incuban durante 18 horas a 37 °C para aislar las colonias sospechosas. La técnica es específica de serogrupos. La

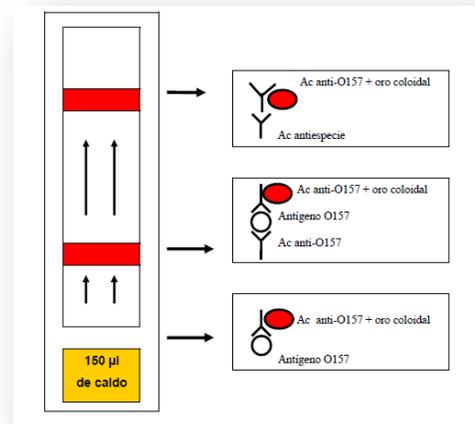


**Fig.1:www.foodylife.com**

recuperación puede estar afectada por la relación bola–organismo, el caldo enriquecido usado y el problema de adsorción no específica de E. coli a las bolas magnéticas (que se puede reducir mediante el uso de una solución de fuerza magnética baja en el procedimiento de IMS y lavado cuidadoso). Estos factores deberían tenerse en cuenta cuando se trata de maximizar la sensibilidad de la técnica para detectar E.coli O157. (OIE, 2004).

### 3.10.6. Inmunocromatografía

Los formatos comerciales presentan una región de siembra y una región inmunocromatográfica, con una zona de ensayo y una zona control donde se producirá la reacción antígeno-anticuerpo.



#### ✓ Fundamento

La muestra sembrada migra en una membrana de nitrocelulosa. En la primera porción se encuentra con una zona que contiene anticuerpos específicos conjugados con partículas de oro coloidal. En caso de estar presente el LPS O157, se forma un complejo antígeno-anticuerpo (marcado con oro) que migra desde la región de siembra hasta la zona de ensayo. En la zona de ensayo se encuentra fijo un segundo anticuerpo contra el LPS O157. Este anticuerpo captura al complejo inmune conjugado con partículas de oro y revela una línea transversal visible de color rojo. El remanente de la muestra continúa migrando a través de la membrana de nitrocelulosa hasta la zona control, donde se encuentran anticuerpos anti-especie, que capturan y agregan los anticuerpos anti-O157 marcados con

oro coloidal para formar una línea roja visible. Esta reacción es independiente de la presencia de antígeno de *E. coli* O157, indicando el correcto funcionamiento del ensayo.

### 3.10.7. Diagnóstico Molecular

#### ✓ Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Adaptado de Rivas, et al.,2008.

Es la amplificación de fragmentos deseados de ácido de nucleico, permitiendo así detectar pequeñas cantidades de ADN o ARN con gran precisión. Esta metodología se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. (centro diagnostico docente, 2011)

#### Fundamento del método

Básicamente la PCR se desarrolla en tres pasos:

- **Desnaturalización:** Para que comience la reacción es necesario que el ADN templado se encuentre como simple cadena, para ello se debe calentar a temperaturas cercanas al punto de ebullición (90-95°C) durante unos minutos, lo que provocará la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Dicha desnaturalización debe ser completa, ya que si es parcial pueden llegar a desnaturalizar las hebras impidiendo la hibridación de los “primers” y una posterior extensión. (Rivas, 2008)

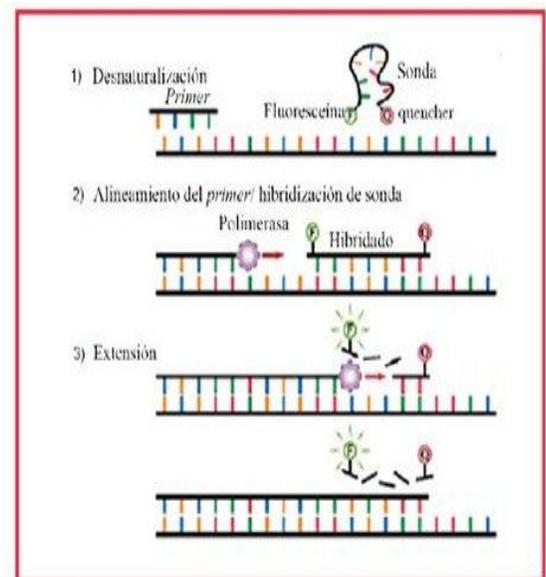
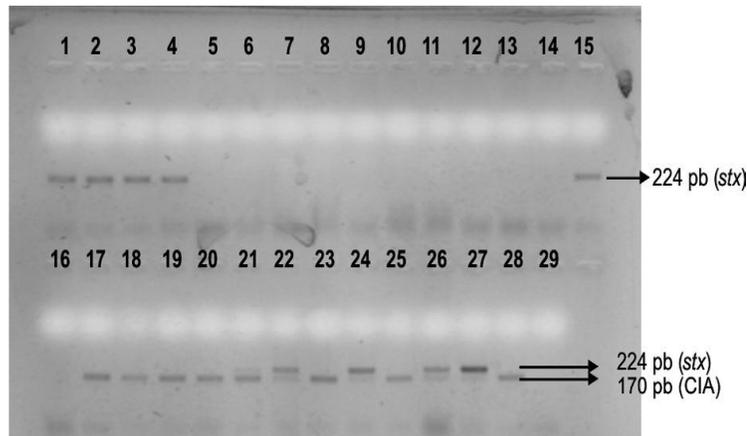


Fig. 2: [www.laboratorioysalud.com](http://www.laboratorioysalud.com)

- **Hibridación:** Una vez desnaturalizado el ADN se disminuye la temperatura hasta un rango entre 40-60°C para conseguir que cada “primer” se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. Cada primer exige una serie de estudios teóricos y experimentales para determinar su temperatura de “annealing”, ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.
- **Extensión:** Consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa, ésta incorpora nucleótidos en el extremo 3' OH del “primer”, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. La repetición de los ciclos de PCR permite la amplificación del ADN en forma exponencial, pudiéndose obtener aproximadamente 1.000.000 de copias a partir de un solo fragmento de ADN original luego de 20 ciclos.

#### ✓ PCR Convencional

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés polimerasa chain reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento servirían como cebadores para que un enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad de fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA.



Adaptado de Roldan, et al., 2007

### ✓ PCR Múltiple

Es la Modificación de la PCR convencional y tiempo real, su principio comprende la amplificación de dos o más moldes de ADN, diferentes entre sí, en una misma reacción.

### ✓ PCR en Tiempo Real

La PCR en Tiempo Real se diferencia de la PCR Convencional en que permite monitorear en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de sondas fluorogénicas que “iluminan o fluorescen” mostrando la cantidad de ADN presente en cada ciclo de amplificación. Cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, por lo que esta es proporcional a la cantidad de ADN generado. Además, el sistema de PCR en Tiempo Real brinda mayor sensibilidad y especificidad, son pruebas rápidas, confiables y permiten procesar grandes cantidades de muestras en menor tiempo.

El resultado de PCR en Tiempo Real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de

ciclos de la PCR en el eje de abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (DNA producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, la cual es en forma exponencial en su inicio, y una tercera fase (plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

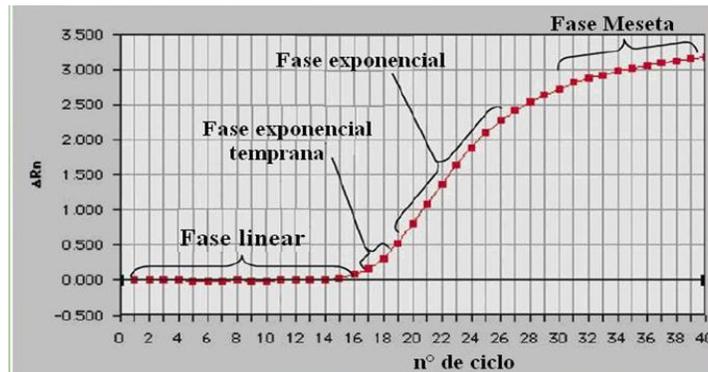


Fig 4. Amplificación de PCR en Tiempo Real mostrando las tres fases de las que consta. 1<sup>er</sup> fase inicial, 2<sup>da</sup> incremento exponencial y 3<sup>er</sup> plateau

El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral, se conoce como Threshold cycle (CT) este es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. A mayor CT, menor será la cantidad de DNA blanco.

### 3.10.8. Ventajas del PCR Tiempo Real

La principal ventaja del PCR tiempo real son la rapidez y la sensibilidad, debido a que obvia procesos adicionales de detección. El uso de sistemas cerrados disminuye el riesgo de contaminación. Los sistemas de PCR tiempo real permite cuantificar la concentración inicial del ADN presente en las muestras con mayor sensibilidad en relación con los procesos de PCR convencional.

Las desventajas de utilizar PCR tiempo real son el costo de reactivos para su elaboración y la necesidad de diseños experimentados más estrictos ante la gran sensibilidad que ofrece la técnica. (Fonseca Mendoza & Mateus Arbelaez, 2010)

## **VII. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **Tipo de estudio**

Descriptivo de corte transversal realizado en los meses de febrero-marzo del 2016.

### **Área de estudio**

Mercado Iván Montenegro.

### **Universo**

El mercado Iván Montenegro cuenta con 12 expendios que distribuyen carne molida.

### **Muestra**

La muestra está constituida por 2 lotes de 5 sub-muestras cada uno para un total de 10 muestras de carne molida analizada.

### **Tipo de muestreo**

No probabilístico por conveniencia

### **Criterios de inclusión**

- ✚ Carne molida no congelada

### **Criterios de exclusión.**

- ✚ No aplican carne de supermercados o empresas distribuidoras.

## **Muestreo y Transporte de la muestra**

Para el muestreo nos trasladamos al Mercado Iván Montenegro para la recolección de la muestra para detectar la presencia de *Escherichia coli* O157, se tomaron carne molida con pesos de 2.5 libras por cada expendio en las condiciones normales de venta al público y se transportaron refrigeradas al laboratorio de microbiología de alimentos del CNDR-Minsa sitio de procesamiento de dichas de muestra. Se utilizó la técnica recomendada por la FDA para productos cárnicos de muestras no compuestas.

## **Análisis y procesamiento de los resultados**

El análisis estadístico se utilizó en base estadística descriptiva y tablas de contingencia. Para la elaboración del documento y realización de la tablas se utilizó los programas Microsoft office Word, Microsoft office Excel y Microsoft office PowerPoint para elaborar de la presentación de la defensa.

## **Consideraciones éticas**

Se realizó una carta de solicitud dirigida a la Dirección del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia CNDR- Minsa solicitando el permiso de procesamiento de muestras de dicho estudio. La información que se obtuvo se manejó bajo confidencia por los investigadores. No se realizó carta para No se pidió consentimiento a los expendedores por que el producto fue comprado.

### **Materiales e Instrumentos a utilizar:**

1. Campana de seguridad tipo 2.
2. Balanza analítica.
3. Stomacher 400 circulator.
4. Centrifuga 5424 – Eppendorf.
5. Thermomixer confort – Eppendorf.
6. Step One Plus Applied Biosystems.
7. Vortex
8. Incubadora.
9. Pipetas automáticas.
10. Puntas.
11. Espátulas
12. Tijeras
13. Pinzas
14. Mecheros
15. Bolsas stomacher
16. Platos Petri
17. Gradillas

### **Medios de cultivos**

1. Agua peptona bufferada modificada con piruvato (mBPWp) y Suplemento acriflavina – cefsulodine – vancomicina (ACV) a una concentración de 22.5 mg/10 mL
2. Agar MacConkey sorbitol con Cefixime [0.1 mg/L] -Telurito [5 mg/L] (SMAC-CT)
3. Agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSAYE)

## Aislamiento de *Escherichia coli* O157 según el BAM-FDA

### Preparación de Antibióticos

- ✓ Medio MacConkey + Sorbito + Telurito de Potasio 5mg/L+ Cefixime 0.1 mg/L
  
- ❖ Pesar 0,25 g de Telurito de Potasio y disolver en 100 ml de agua y esterilizar por filtración de membrana. Concentración de 2.5 mg/L. Guardar el antibiótico a temperatura de cuarto por 1 mes.
- ❖ Agregar 2 ml a 1000 ml de agar MacConkey para una concentración final de 5 mg/L
- ❖ Pesar 5,0 mg de Cefixime y disolver en 100 ml de agua y esterilizar por filtración de membrana. Concentración de 0.05 mg/L. Guardar a 3 °C +/- 2°C por 1 semana.
- ❖ Agregar 2 ml a 1000 ml de agar MacConkey para una concentración final de 0.1 mg/L
  
- ✓ Suplemento para Agua Peptonada Bufferada con piruvato APBp Acriflavin-Cefsulodin-Vancomicina (ACV)
  
- ❖ Pesar 225 mg de Acriflavin y diluir en 100 ml de etanol al 95 %. Esterilizar por filtración de membrana para la cantidad de 50 muestras.
- ❖ Agregar 2 ml de este suplemento a cada botella de 450 ml de APBp.
- ❖ Pesar 225 mg de Cefsulodin y diluir en 100 ml de etanol al 95 %. Esterilizar por filtración de membrana para la cantidad de 50 muestras.
- ❖ Agregar 2 ml de este suplemento a cada botella de 450 ml de APBp
- ❖ Pesar 180 mg de Vancomicina y diluir en 100 ml de agua destilada estéril. Esterilizar por filtración de membrana para la cantidad de 50 muestras.
- ❖ Agregar 2 ml de este suplemento a cada botella de 450 ml de APBp.

## **Enriquecimiento**

- ❖ Pesar 50gr de la muestra de carne molida en una bolsa stomacher.
- ❖ Agregar a la bolsa 450 ml de Agua peptona bufferada modificada con piruvato (mBPWp) y Suplemento acriflavina – cefsulodine – vancomicina (ACV).
- ❖ Mezclar.
- ❖ Incubar a 42 °C durante 24 horas.

## **Aislamiento**

- ❖ Después de 24 h de incubación en el medio de enriquecimiento APBp + Antibióticos, realizar diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  y sembrar en Agar MacConkey + sorbitol +Telurito de Potasio 5 mg/L + Cefixime 0.1 mg/L
- ❖ Incubar a 37°C por 24 horas.
- ❖ Características de colonias en agar SMAC-T: colonias pequeñas y transparentes.
- ❖ Características de colonias en CHROMAgarO157 Colonias pequeñas, color malva.

## **Dynabeads anti-E.coli O157**

### ✓ **Separación inmunomagnética:**

- a) Remover la magneto.
- b) Resuspender el Dynabeads pipetear 20 ul en el tubo.
- c) Adicionar el 1 ml del pre-enriquecimiento y cerrar el tubo
- d) Invertir el Rack Dynal MPC-S e incubar a Temperatura de cuarto por 10 minutos. Agitar continuamente. Insertar el tubo en el plato magnético e invertir el rack por 3 minutos.
- e) Abrir el tubo, aspirar y descartar la muestra.
- f) Adicionar 1 ml de agua de lavado PBS Teew 20.
- g) Repetir el paso 5-8
- h) Repetir el Paso 5-7



- i) Resuspender el Dynabeads con 100 ul del agua de lavado Listo para la Detección
- j) Agregar 25 ul al medio SMAC-T y 25 ul para El medio CHROMagar O157.

### **Otras Pruebas**

#### **✓ Producción de Indol**

- a) Inocular colonias sospechosas de *Escherichia coli* O157 en MIO e incubar a 37°C por 18-24hr.
- b) Luego se incorporar 3-4 gotas de reactivo de Kovac por la pared interna del tubo
- c) Positivo: color rosado intenso.
- d) Negativo: color transparente.

#### **✓ Prueba de citrato:**

- a) Tomar una colonia aislada sospechosa de ser *Escherichia coli* O157 y se inocula en estría en la superficie del medio (pico de flauta).
- b) El tubo se incuba a 37°C durante 18-24 horas.
- c) Positivo: Se observa de color azul
- d) Negativo: No hay viraje de color.

#### **✓ Caldo EC:**

- a) Tomar una colonia aislada sospechosa de ser *Escherichia coli* O157 y se inocula en el caldo.
- b) El tubo se incuba a 44.5°C durante 18-24 horas.
- c) Positivo: Se observa producción de gas en el tubo de Durham.
- d) Negativo: No se observa producción de gas en el tubo de Durham.

✓ **Caldo EC + MUG:**

- a) Tomar una colonia aislada sospechosa de ser *Escherichia coli* O157 y se inocula en el caldo.
- b) El tubo se incubaba a 37°C durante 18-24 horas.
- c) Positivo: Se observa Fluorescente.
- d) Negativo: No se observa Fluorescencia.

**Extracción de ADN**

1. En un vial agregar 200 µl de Agua estéril libre de ADN.
2. Agrega de 3-5 colonias sospechosas de *Escherichia coli* O157
3. Incubar 10 minutos en el ThermoMixer a 99 °C.
4. Centrifugar a 12000 rpm x 3 minutos.

**5P Multiplex PCR para confirmar la O157**

Para el control positivo, se usó ADN de una ce O157, colonias grises (CECT 4387) para la detección de los 5 genes de virulencia (*Stx<sub>1</sub>*, *Stx<sub>2</sub>*, *eaeA*, *uidA*, *ehxA*).

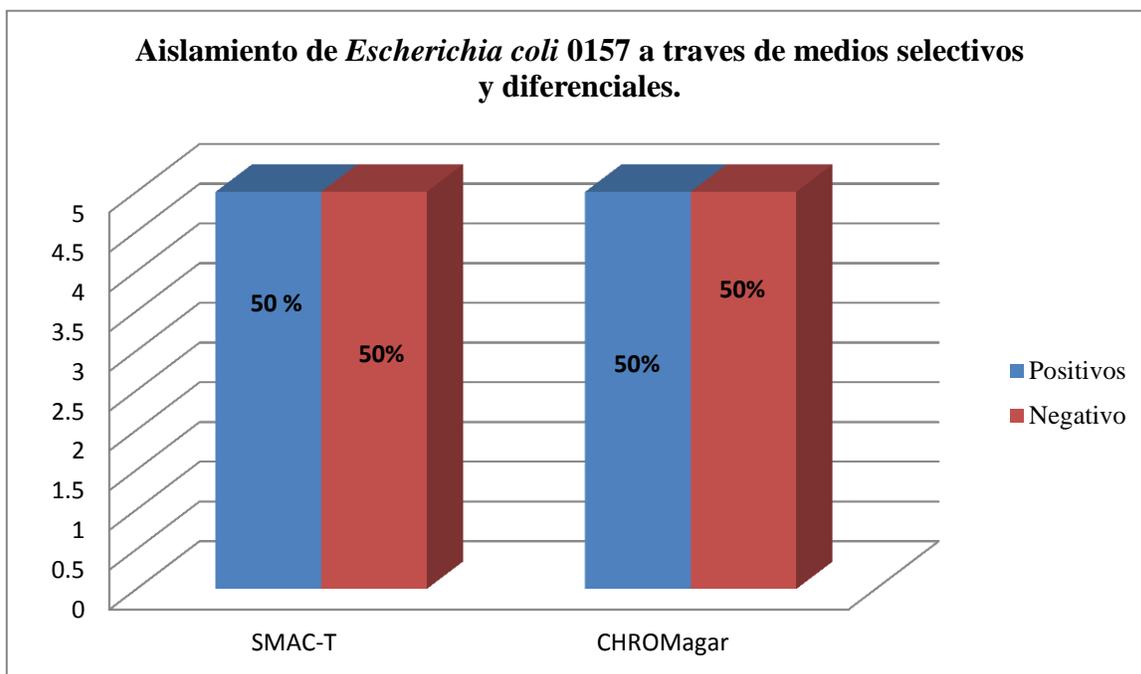
Preparamos una mezcla maestra 10X de los cebadores que contienen 2 µM de los 10 cebadores. La mezcla maestra de los cebadores se almacenara a -20 ° C. Se utilizó 5 µl por cada 50 µl de volumen de reacción para una concentración final de 0.2 µM para cada cebador. La mezcla de 50 µl de PCR contiene 1X de Taq polimerasa tampón (invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 250 µM de dNTP, 2 µl de molde de ADN crudo, 1X de mezcla maestra de los cebadores, 3,75 U de HotStarTaq (invitrogen) y agua estéril. Las condiciones de PCR son: 95°C durante 15 min; 25 ciclos, consistiendo cada ciclo de: 95°C durante 1 min, 56°C durante 1 min y 72°C durante 1 min y 72 ° C para una extensión final de 5 min. Examinaremos los amplicones en gel de agarosa al 1% en electroforesis (1X TBE Tris-borato - EDTA) tampón de pH 8,2

## VIII. OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

Variable	Subvariable	Indicador	Valor	Criterio
Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> O157según FDA-BAM	SMAC-T	No fermenta el Sorbitol.	Hubo crecimiento bacteriano.	colonias pequeñas y transparente
			No hubo crecimiento bacteriano.	-
	CHROMagar O157	$\beta$ -D - galactosidasa y $\beta$ -D- glucuronidasa	Hubo crecimiento bacteriano	Colonias color malva (positivas) colonias azules (negativo otras enterobacterias).
			No hubo crecimiento bacteriano	-
	MIO	Movilidad	Negativo	No hay Turbidez.
			Positivo	Turbidez
		Indol	Negativo	Anillo Transparente
			Positivo	Anillo Rosado
		Ornitina	Negativo	No hay Viraje de color
			Positivo	Intensificación del color violeta
	Citrato	Azul de	Positivo	Viraje de color del medio de verde a azul

	EC	bromotimol.	Negativo	No hay cambio de color
		$\beta$ -D-galactosidasa	Negativo	No hay Burbujas en campana de Durham
			Positivo	Presencia de burbujas en campana de Durham
	EC+MUG	$\beta$ -D-glucuronidasa, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -glucurónido	Negativo	No hay Fluorescencia
			Positivo	Fluorescencia
	Detección de <i>Escherichia coli</i> O157 por PCR en convencional	Métodos de extracción con Agua estéril libre de ADN	Amplificación de un fragmento de ADN específico	Positivo
Negativo				No hay Amplificación de ADN

## IX. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS



Fuente: Tabla 1

**Grafico 1. Aislamiento de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res según la norma internacional FDA-BAM a través de medios selectivos y diferenciales**

En Nicaragua no se reportan estudios en carne molida de res en el que se allá aislado *Escherichia coli* O157, sin embargo existen estudios limitados en el área clínica en La Universidad Autónoma de Nicaragua-, UNAN-León realizada por Vílchez, S en 2014 (Caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica en muestras diarreicas en Hospitales de Nicaragua.)

Con respecto al aislamiento de *Escherichia coli* O157 se decidió analizar la carne molida fresca de res debido a que dicho ganado es considerado como el principal reservorio de esta bacteria a nivel mundial. En nuestro estudio se logró aislar 5 de las 10 muestras analizadas para *Escherichia coli* O157, lo que nos demuestra que dicha matriz debido a su manipulación es más susceptible a una contaminación microbiana poniendo en evidencia las deficientes condiciones higiénicas en la que este alimento fue procesado además de las características nutritivas propias de la carne, así como su pH de 7.0 y una Temperatura inadecuada superior a 5 °C son condiciones que favorecen el desarrollo de este tipo de microorganismo.

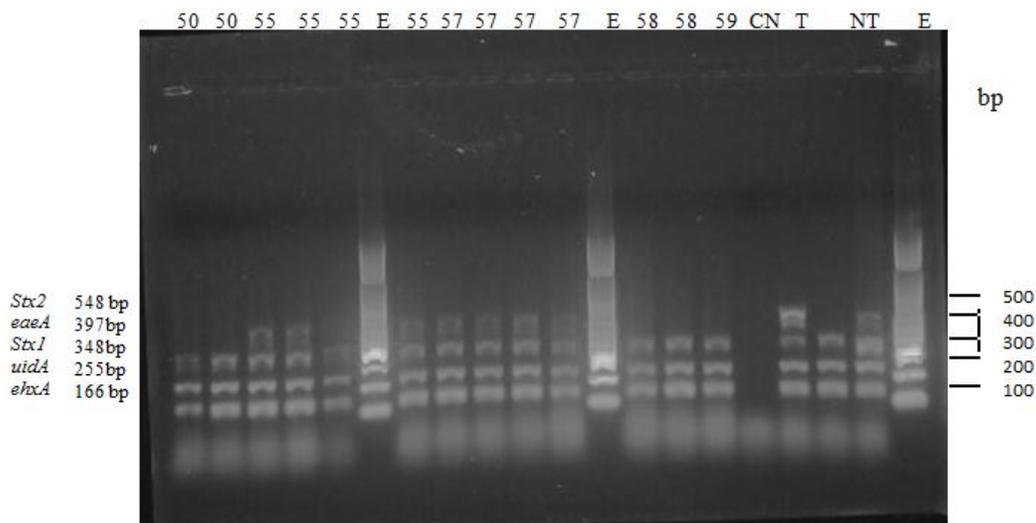
Diversas investigaciones epidemiológicas como la realizada en Canadá en la que aisló 6 muestras de 64 en carne molida. En España se recuperó 3 de 33 muestras analizadas. En Lima, Perú se realizó otra investigación por Huguet J., B. Huapaya & E. Salazar en 2002 que logró detectar 3 muestras de 197 analizadas en carne molida picada por su parte Nueva Zelanda se determinó la presencia de *Escherichia coli* O157, 1 de 750 muestras mezcladas de carne molida y carne de cerdo.

En los resultados de los estudios mencionados anteriormente realizados por Monreal, 1996; Hancock y col., 1997, se puede observar aislamientos inferiores a los resultados obtenidos en nuestra investigación en la que obtuvimos el 50% de aislamiento en las muestras analizadas. Esto es importante mencionarlo por que dicha carne se considera estéril cuando el animal aún está vivo.

Es preciso considerar que el resultado obtenido en este estudio puede estar influenciado por la calidad sanitaria del alimento que puede estar comprometido por la deficiencia de un eslabón de la cadena de producción, la elección de las muestras analizadas y el método empleado para la detección de la bacteria. Como lo descrito en un estudio realizado en el Salvador en el que detecto un 23.3% de *Escherichia coli* O157, constituyendo un desafío

para la determinación de las fuentes de contaminación y la respuesta de la problemática en la manipulación de los alimentos. El lograr aislar 50% de muestras de la especie de *Escherichia coli* O157 indica que el método utilizado (FDA-BAM) fue adecuado para el aislamiento.

**Figura 1. Detección Genes de virulencia presentes en muestras de Carne molida de res por PCR Convencional.**



Fuente: Resultado de PCR Convencional.

De las 10 muestras procesadas 5 presentaron diferentes Genes de virulencia stx2, eaeA, uidA y ehxA: Stx2 (2) muestras, uidA, eaeA, ehxA (5) muestras considerados como característicos de *E. coli* O157 y que se presentan con elevada frecuencia en las cepas aisladas en la mayoría de los países del mundo según Blanco et al. 2004.

Si bien los miembros de la familia de Stx muestran similitud en su estructura y función, cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1 según

Rivas, et al., 2008. En Lima, Mora et al. 2007. Así mismo sea determinado que Stx y Stx2 son más citotóxico en células Vero que las variantes Stx2c y Stx2d esto se debe a la variantes de la secuencia nucleotica de la sub unidad B responsable de la unión de la toxina al receptor Gb3.

Los genes que codifican los factores de virulencia provienen de fagos y plásmidos; pueden no estar presentes, adquirirse o perderse. La ausencia de la producción de estas toxinas puede ser debida a la inestabilidad de los genes que se pierden como resultado de repetitivos cultivos en el laboratorio. Por lo tanto, es explicable que en países en los cuales no causan enfermedad o su prevalencia es baja es difícil la detección de cepas de *E. coli* O157.

Las cepas que carecen de factores de virulencia podrían adquirirlos por transferencia horizontal de genes, en el intestino del humano o de animales, especialmente rumiantes o en desagües domésticos (Muniesa & Jofre 2004). *Echerichia coli* debido a la plasticidad de su genoma es capaz de generar combinaciones de genes que pueden conducir a la aparición de cepas muy agresivas o no conferir patogenicidad. Se requieren otros genes de virulencia para adherirse y dañar la célula de la pared intestinal.

El período de incubación es de 3 a 4 días, aunque puede ser tan corto como de un día o tan largo como de ocho días. Por razones desconocidas, la excreción de *E. coli* O157 varía con la edad. Lo que se explica en nuestro estudio que los individuos que consumieron la carne molida de res presenten la infección asintomática o permanecer como portador por algún período después de haberse infectado.

## X. CONCLUSIONES

1. Se analizó por medio del Método Estándar Internacional FDA-BAM, un total de 2 lotes (10 muestras) de carne molida de res del Mercado Iván Montenegro, de las cuales se aislaron 5 muestras (50%) con las características propias de *Escherichia coli* 0157 comparadas con la cepa control CECT 5947 no Toxigenica.
2. En relación a la técnica de PCR Convencional para la detección de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res se obtuvo un 50% de muestras positivas con genes de virulencia (stx1/2, eaeA, uidA y ehxA) considerados como característicos de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

## **XI. RECOMENDACIONES**

### **Al Ministerio de Salud:**

1. Aplicar programas de vigilancia epidemiológica que permita detectar oportunamente la presencia de cepas de *E. coli* enterohemorrágica O157 en carne de res.
2. Identificar la presencia de *Escherichia coli* 0157 en otros tipos de alimentos como: frutas, vegetales, lácteos, agua y otros tipos de carne. A si como también clínicamente en muestras de heces de personas con padecimientos diarreicos de origen bacteriano.

### **A COMMEMA:**

3. A las autoridades sanitarias que verifiquen y monitoreen periódicamente el estado y calidad de las carnes en expendios de los mercados y que se les exija a estos últimos el cumplimiento de las condiciones adecuadas de almacenamiento y manipulación de las carnes desde que llega al establecimiento hasta las manos del consumidor.
4. A los comerciantes poner en práctica las medidas higiénicas sanitarias necesarias en los expendios para la reducción del riesgo de contaminación.
5. A los distribuidores Cumplir con medidas higiénicas en la manipulación y procesamiento de las carnes para evitar contaminación cruzada con dicho microorganismo de interés evitando así la infección en el consumidor.

## XII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Eschechrichia coli enterohemorrágica. (2010). *The center for food security y public health*, 1-12.
2. Bonivento, J., Molina, A., & Maestre, R. (2011). *Biociencia*, 53-61.
3. COMMEMA. (2005). *Situación de las enfermedades transmitidas por alimentos en mercados de Nicaragua*.
4. Dominguez, M. (s.f.). *La escherichia coli enteropatógena y sus factores de patogenicidad*.
5. FAO. (s.f.). *Marco de gestión de crisis para la cadena alimentaria*. Obtenido de [www.fao.org/foodchain/es](http://www.fao.org/foodchain/es)
6. FAO/OMS. (2005). Memoria de la conferencia regional sobre inocuidad de alimentos para las Américas y el Caribe.  
  
Jure, M., Condori, S., Leotta, G., Chinen, I., Miliwebsky, E., & Allori, C. (2010). Detección, aislamiento y caracterización de Escherichia coli productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, Provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*, 42:284-287.
7. Llantin, N. N. (2008). *Avalúo Microbiológico de Peligros y comparación de carne molida de venta al detal de procesadores locales de Puerto Rico y los importados de Estados Unidos*. Mayagüez: Universidad de Puerto Rico.
8. Lound, L., & Tanaro, J. D. (2013). *Síndrome Uremico Hemolítico*. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de Entre Ríos.
9. *Marco de gestión de crisis para la cadena alimentaria*. (s.f.). Obtenido de [www.fao.org/foodchain/es](http://www.fao.org/foodchain/es)

10. Margall, N., Dominguez, A., Prats, G., & Salleras, L. (1997). Escherichia coli Enterohemorrágica. *Revista Española Salud Pública*, 437-443.
11. Martínez, S. M., & Platero, L. A. (2007). *Determinación de Escherichia coli O157:H7 en carne molida de res cruda, comercializada en supermercados del área metropolitana del salvador*. San Salvador: Universidad de El Salvador.
12. Marzocca, M., Marucci, P., Sica, M., & Alvarez, E. (2006). Detección de Escherichia coli O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología*, 38-40.
13. Méndez, C., Vergaray, G., Morante, H., & Flores, P. y. (2013). Aislamiento y caracterización de Escherichia coli O157:H7 a partir de carne molida de bovino en lima-peru. *Revista Peruana Biologica*, 159-164.
14. Michanie, S. (2003). Escherichia coli O157:H7 la bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. *Ganados y Carnes*, 40-42.
15. MINSA. (2005). *Situación epidemiológica de la enfermedad diarreica aguda en Nicaragua*.
16. Olvera, A., Signorini, M., & Tarabla, H. (2010). Escherichia coli verotoxigena: modelo cuantitativo de exposición y escenarios de riesgos en canales bovinas en Argentina. *Revista Panama Salud Publica*, 403-413.
17. Orozco, M., Luz, R., Lopez, L., & Franco, P. (2013). Determinación de Escherichia coli e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de cartagena. *Revista Lasallista de Investigación*, 2-6.
18. Rivas, M., Leotta, G., & Chinen, I. (2008). Diagnóstico y caracterización de Escherichia coli O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. *WHO Global Salm Surv*, 1-75.
19. Rodríguez, D., Batista, R., & Feal, P. (9 de octubre de 1997). *Unidad de análisis y tendencias en salud*. Obtenido de Reporte Técnico de vigilancia:

20. Rodriguez, g. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mexico*, 465-473.
21. Roldan, M., Chinen, I., Otero, J., Miliwebsky, E., Alfaro, N., Burns, P., & Rivas, M. (2007). Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Revista Argentina de Microbiología*, 113-119.
22. Salim, M., I, J. V., & Arrieta, G. (2001). *E. coli* O157: H7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado. *Revista MVZ Córdoba*, 15-23.
23. Srednik, M., Rumi, M., & Betancor, A. (2013). Inocuidad de carne molida y presencia de cepas *Escherichia coli* causantes de lesiones de adherencia y esfacelación. *Revista Argentina*, 123-130.
24. Tanaro, J., Leotta, G., Lound, L., & Deza, N. (2013). Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de bovinos, agua ambiental y muestras clínicas. *Ciencia, Docencia Y tecnología*, 3-6.
25. Vilchez, S., Becker-Dreps, S., Amaya, E., Pérez, C., Paniagua, M., Reyes, D., . . . Weintraub, A. (2014). Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from Nicaraguan children in hospital, primary care and community settings. *Journal of Medical Microbiology*, 729-134.
26. Vilchez, S., Reyes, D., Paniagua, M., Bucardo, F., Möllby, R., & Weintraub, A. (2009). Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *Journal of Medical Microbiology*, 630-637.

# **ANEXOS**

## I.ANEXOS

**Tabla 1. Aislamiento de *Escherichia coli* O157 a través de medios selectivos y diferenciales.**

<b>Numero de Muestras</b>	<b>SMAC-T*</b>	<b>CHROMagar*</b>	<b><i>E.coli</i> O157</b>
1050*	+	+	Presente
1051	-	-	Ausente
1052	-	-	Ausente
1053	-	-	Ausente
1054	-	-	Ausente
1055*	+	+	Presente
1056	-	-	Ausente
1057*	+	+	Presente
1058*	+	+	Presente
1059*	+	+	Presente

(+): Positivo; (-): Negativo

\*Colonias características de *Escherichia coli* O157

\*SMAC-T colonias pequeñas transparentes, Sorbitol (-)

\*CHROMagar colonias color malva.

**Tabla 1.1. Aislamiento de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res.**

	<b><i>Cantidad</i></b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	5	50
<b>Positivo</b>	5	50
<b>total</b>	10	100%

**Tabla 3. Genes de virulencia presentes en muestras de Carne molida de res por PCR Convencional.**

1050*	-	-	+	+	+
1051	-	-	-	-	-
1052	-	-	-	-	-
1053	-	-	-	-	-
1054	-	-	-	-	-
1055*	-	+	+	+	+
1056	-	-	-	-	-
1057*	-	+	+	+	+
1058*	-	-	+	+	+
1059*	-	-	+	+	+

(+): Positivo; (-): Negativo

\*cepas de E. Coli O157 que presentan genes de virulencias.

**Tabla 3.1. Detección de *Escherichia coli* O157 por PCR convencional.**

	<b>Cantidad</b>	<b>%</b>
<b>Positivos</b>	5	50
<b>Negativos</b>	5	50
<b>Total</b>	10	100

**Tabla 4. Programa de Amplificación**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura ° C</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº ciclos</b>
<b>Desnaturalización</b>	<b>95</b>	<b>15 min</b>	
<b>Desnaturalización</b>	<b>95</b>	<b>1 min</b>	<b>25</b>
<b>Anillamiento</b>	<b>56</b>	<b>1 min</b>	
<b>Extensión</b>	<b>72</b>	<b>1 min</b>	
<b>Extensión</b>	<b>72</b>	<b>5 min</b>	

**Tabla 5. Secuencias de cebadores de PCR y tamaños de amplificación esperados**

<b>Gen</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Amplificación</b>
<i>Stx1</i>	LP30	5' CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG 3'	348 bp
	LP31	5' CACCAGACAATGTAACCGCTG 3'	
<i>Stx2</i>	LP43	5' ATCCTATTCCTCGGGAGTTTACG 3'	548 bp
	LP44	5' GCGTCATCGTATACACAGGAGC 3'	
<i>uidA</i>	PT-2	5' GCGAAAACGTGGAATTGGG 3'	252 bp
	PT-3	5' TGATGCTCCATCACTTCCTG 3'	
<i>eaeA</i>	AE22	5' ATTACCATCCACACAGACGGT 3'	397 bp
	AE20-2	5' ACAGCGTGGTTGGATCAACCT 3'	
<i>ehxA</i>	MFS1Fb	5' GTTTATTCTGGGGCAGGCTC 3'	166 bp
	MFS1R	5' CTCACGTCACCATACATAT 3'	

**Tabla 6. Preparación de Gel de Agarosa**

<b>Preparación de TBE 10X</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Tris Base</b>	108 g
<b>Ácido bórico</b>	55 g
<b>EDTA</b>	7.44
<b>Agua Destilada</b>	1000 ml

**TBE 1X**

**100 ml de TBE 1X + 900 ml de agua destilada**

**Gel de agarosa al 1%**

**1 g de agarosa + 100 ml de TBE 1X**

**Tabla 7. Protocolo PCR múltiple**

<b>Corrida Múltiple PCR-Convencional NOVA</b>			
	<b>25 de reacción</b>		
	1 mx	3 mx	[Final]
<b>Buffer Taq [10X]</b>	2.5	7.5	[1X]
<b>MgCl<sub>2</sub> [50 mM]</b>	1	3	[3 mM]
<b>Taq [5 U/μl]</b>	0.75	2.25	3.75 U/μl
<b>Primer [10 μM]</b>	1	3	0.2
<b>DNTPs [5 mM]</b>	1.25	3.75	0.2
<b>Template</b>	2.5	7.5	
<b>Agua</b>	16	48	
<b>Total</b>	25	75	

**Tabla 8. Cepas de Referencia**

<b>Escherichia coli 25922</b>	<b>Negativo</b>
<b>Escherichia coli CECT 5947 Cepa no Toxigenica</b>	<b>Positivo</b>
<b>Escherichia coli CECT 4783 Cepa Toxigenica</b>	<b>Positivo</b>

**Tabla 9. Preparación de antibioticos**

**Según las Norma ISSO 16654:2001**

<b>Concentración 0.05 mg/L</b>	
Cefixime	5,0 mg
Agua	100 ml

<b>Concentración 2.5 mg/L</b>	
Telurito de Potasio	0,25 mg
Agua	100 ml

Medio MacConkey + Sorbitol + Telurito de Potasio + Cefixime

<b>Composición</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración</b>
MacConkey + Sorbitol	1000 ml	
Cefixime	2 ml	0.1 mg/L
Telurito de Potasio	2 ml	5 mg/L

## Según Manual Analítico Bacteriológico

Suplemento para APBp Acriflavin-Cefsulodin-Vancomicina (ACV)

Suplemento	Concentración	Volumen / 450 ml APBp	Total de Muestra
Acriflavin	225 mg/ 100 ml	1.98 ml	Para 1 mx
Cefsulodin	225 mg/ 100 ml	1.98 ml	Para 1 mx
Vancomicina	180 mg/ 100 ml	1.98 ml	Para 1 mx

**Tabla 10. Preparación de Medios de cultivo**

Medio utilizado para fines generales para el cultivo de microorganismos fastidiosos y no fastidiosos

Agar Tripticasa de Soja (TSA)	
Triptona	15 g
Soitona	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
AD	1000 ml
pH final a 25 °C 7,3 ± 0,2	

Medio selectivo y diferencial empleado para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

---

**Agar MacConkey Sorbitol**

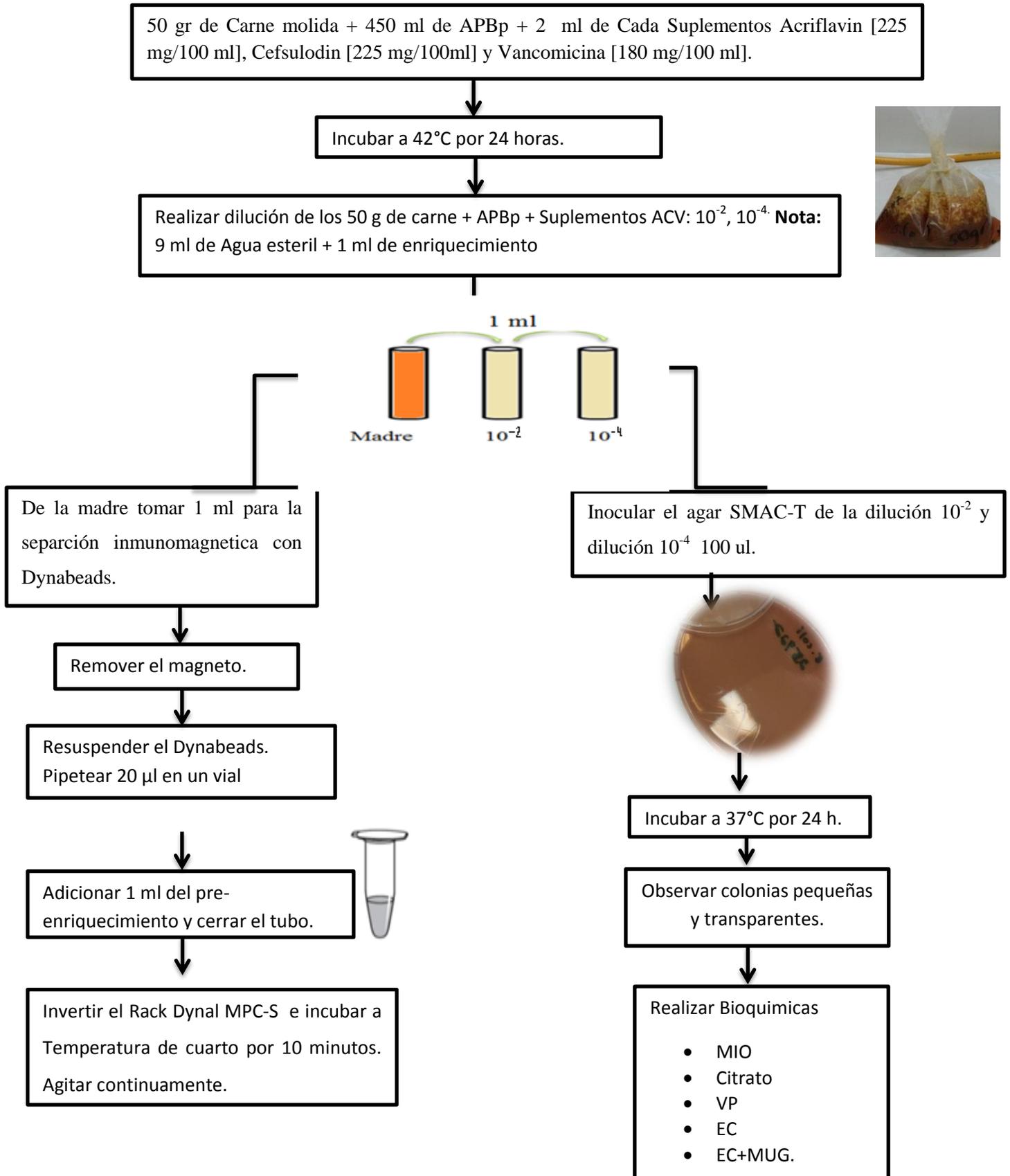
---

<b>Peptona</b>	20 g
<b>Sorbitol</b>	10 g
<b>Sales biliares N°3</b>	1,5 g
<b>Cloruro de sodio</b>	5 g
<b>Rojo neutro</b>	0,03 g
<b>Cristal violeta</b>	0,001 g
<b>AD</b>	1000 ml
<b>Agar</b>	15 g
<b>pH final a 25 °C 7,1 ± 0,2</b>	

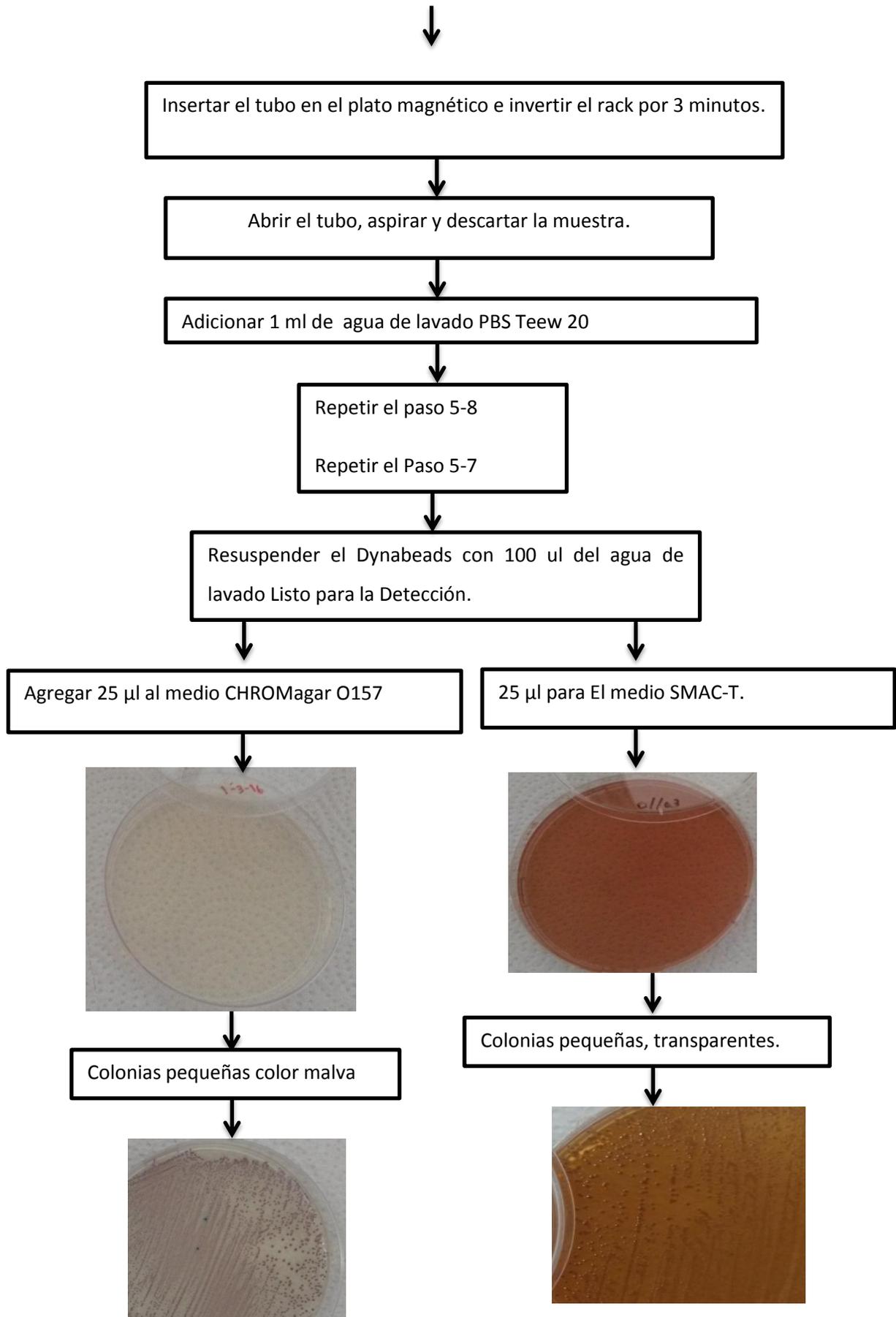
---

## II. ANEXO

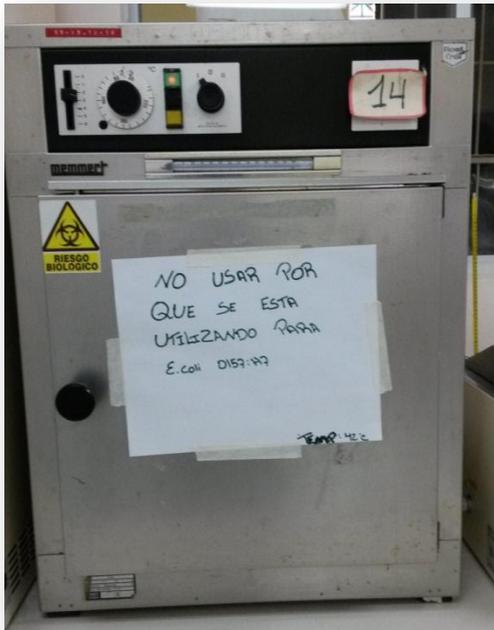
### Flujograma *Escherichia coli* O157:H7



## Dynabeads Continuación



## Equipos utilizados



Incubadora



ThermoMixer C



Campana de Bioseguridad  
labconco



Centrifuge 5424 Eppendorf



Vortex



Balanza metler Toledo ML1502E

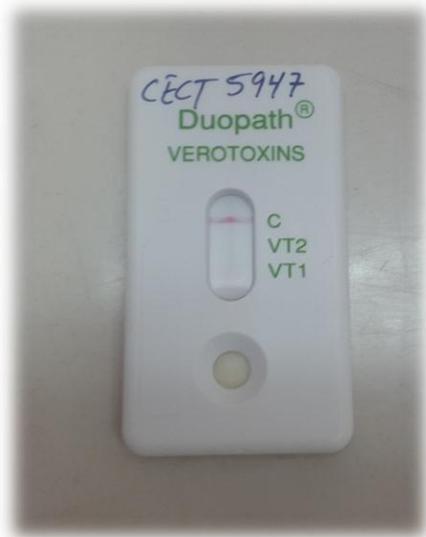
### Cepas de referencia



Cultivo Liofilizado *Escherichia coli*  
serotipo O157:H7 toxigenica CECT  
4783



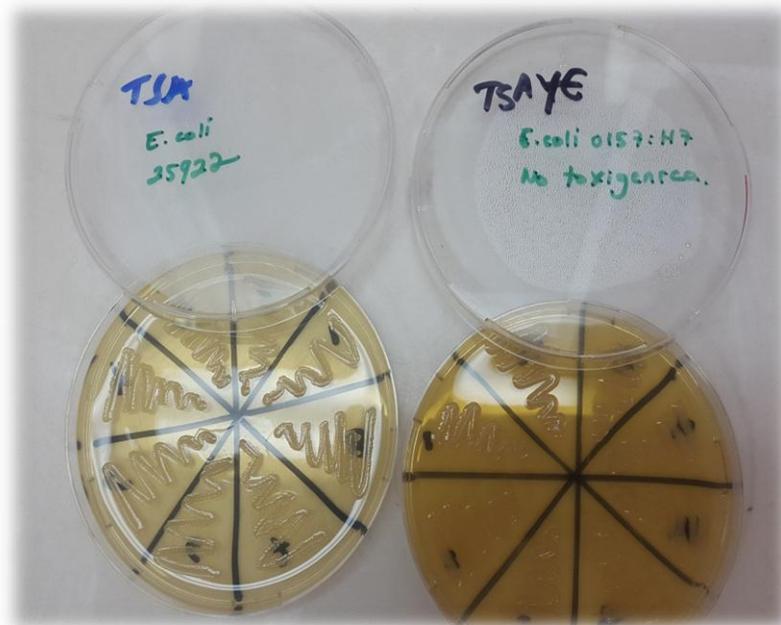
Cultivo Liofilizado *Escherichia coli*  
serotipo O157:H7 no toxigenica CECT  
5947



Test rápido para detección de Verotoxina.  
Cepa no toxigenica 5947 (no hay presencia de Vetoxinas)



Test rápido para detección de Verotoxina.  
Cepa toxigenica 4783 (presencia de Vetoxinas 1 y 2)



Izquierda: *Escherichia coli* ATCC 25922 y a la Derecha: *Escherichia coli* no toxigenica CECT 5947

## Gel de Agarosa con Bromuro de Etidio.

